



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12Q 1/66, 1/04, G01N 21/64, 21/76</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/39329</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月6日(06.07.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/07417</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月28日(28.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/374479 1998年12月28日(28.12.98) JP 特願平10/374480 1998年12月28日(28.12.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サッポロビール株式会社 (SAPPORO BREWERIES LTD.)(JP/JP) 〒150-0013 東京都渋谷区恵比寿4丁目20番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 高橋寿洋(TAKAHASHI, Toshihiro)(JP/JP) 〒425-0013 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株式会社 醸造技術研究所内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 伊東忠彦(ITO, Tadahiko) 〒150-6032 東京都渋谷区恵比寿4丁目20番3号 恵比寿ガーデンプレイスタワー32階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: METHOD OF COUNTING MICROORGANISMS AND DEVICE FOR ACCOMPLISHING THE COUNTING</p> <p>(54)発明の名称 微生物計数方法及びそれを達成するための装置</p> <p>(57) Abstract A filter that has captured live bacteria is treated by an extraction reagent and a luminous reagent, an emission status of the filter is imaged by a television camera (1) comprising an optical system and an imaging means (such as CCD), the number of luminescent points is counted from image data of microorganism-derived fluorescent luminescent points via an image processor (3) and data analyzer (4), and the results are displayed on a display (5). If luminescent points exist around and adjacent to one luminescent point during the data analysis, a group of these luminescent points are counted as one point. Effects by a diffused light generated from a luminescent point with a large luminance are also removed. Accordingly, counting errors that might be encountered when a shape of a luminescent point derived from one microorganism is complicated or that might be caused by effects by a diffused light generated due to a large luminance can be minimized.</p>		

(57)要約

生菌を捕捉したフィルターを抽出試薬及び発光試薬で処理した後、光学系及び撮像手段（CCD等）で構成されたテレビカメラ1でフィルターの発光状態を撮影し、画像処理装置3、データ解析装置4を介して微生物に由来する蛍光の輝点の画像データから輝点お数を計数し、その結果をディスプレイ5に示す。データ解析をするににあたり、1個の輝点の周囲に隣接して輝点が存在する場合には、それらの集合を1個として計数する。また、輝度の大きい輝点から発生する拡散光による影響を除く処理も行う。これにより、1個の微生物に由来する輝点の形状が複雑となっている場合や、輝度が大きいことに伴って発生する拡散光の影響による計数誤差を少なくすることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ		共和国	TR	トルコ
BV	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

微生物計数方法及びそれを達成するための装置

5 技術分野

本発明は、ATP-ルシフェラーゼ法を利用した微生物迅速検査法に係り、特に微生物の存在を現す発光現象の映像から電氣的に正確に菌数又は菌のコロニーの数をカウントできるようにした微生物迅速検査法及びこれを達成するための装置に関する。

10

背景技術

微生物の存在を確認する方法として、ATP-ルシフェラーゼ法がある。このATP-ルシフェラーゼ法は、生きた細胞に特異的にまとまって存在するアデノシン三リン酸(ATP)を利用してルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(R-R

15 反応)を行わしめ、ATP含量に比例して発生する微妙な発光を高感度検出器で検出することにより、微生物の存在を確認する方法であり、微生物の迅速検査法として注目されている。

この微生物の検査法を行う方法及び装置として、例えば、特開平6-237793号に示されているものがある。ここでは、先ず、検体液を濾過して生菌をフィルター上に補足し、このフィルターを微生物発光画像解析システムを用いて検出

20 する。この微生物発光画像解析システムは、生菌を捕捉したフィルターを抽出試薬及び発光試薬で処理した後、標本ホルダーにセットし、光学系及び撮像手段(CCD等)で構成されたテレビカメラを上記フィルターにできるだけ近接させてセッティングし、フィルターの発光状態を撮影し、画像処理装置、データ解析

25 装置を介して画像データをディスプレイで表示、観察したり、解析結果をプリントアウトする。

図1は、そのシステムの概要を示し、1はテーパファイバー、光増幅部及び撮像管からなる高感度テレビカメラ、カメラコントローラ2、イメージプロセッサ3、データ解析装置4、テレビモニター5から構成されている。測定は、発光

処理した生菌を保持したフィルター 6 を高感度テレビカメラ 1 に接近させておき、カメラコントローラ 2 及びイメージプロセッサ 3 を用いて 2 次元的光子を所定時間、例えば、30～180 秒間蓄積し、菌体からの発光を撮像し、データ解析装置 4 により発光ノイズを消去して生菌による強い発光のみを残してテレビモニター 5 に表示する。この処理によって菌体由来以外の発光がノイズとして消去され、測定された輝点数は生菌の数又はコロニーの数となる。その発光状態を現す映像であり、培地上で R-R 反応をおこさせ、微生物の存在する位置が周囲に対して明るく発光しており、これらの輝点の数が微生物の数に相当する。

このように、微生物の存在と数を画像解析を用いて自動的に検出する装置は既に存在している。しかしながら、これまでの検出装置においても不具合は存在していた。図 2 はフィルターの ATP の発光状態を撮影した映像を示す。検出装置が強い光を認識した場合は、高いピークとなって現れ、モニター上ではピークの高さに応じた疑似カラーの点として表示される。

輝点は、図 2 の上部のウインドウ（白い四角）内の輝点のように白い輝点となって表示される。また、図 2 の下方は輝点を 3 次元的に現したものである。3 次元の画像において、界面のように波打っている部分が画像データのバックグラウンド（BKG）となる青い点の集合を示し、広い輝点は中央の高いピークの束となって表示される。これらのピークは全て数値化されており、必要な座標のピーク強度がデータとして記憶される。画像データの低いレベルで揺らいでいるピーク強度を平均化し、この値を基準にしてある値（閾値）以上の高さで面積を持つピークを認識した場合に輝点 1 つとしてカウントする。

画像に表示された点が ATP による輝点か BKG かを区別するために、輝点と BKG を区別するための閾値は、検出する菌の種類や BKG の高さにより設定される。

上述のように、閾値を設定してカウントする従来の検出装置は、輝点を弁別するという点では有効であったが、目視で数えた輝点数と差がでてくる場合があった。これは、従来のカウントの方法が、ピークの高さと面積だけを基準となされており、これだけでは、種々の形状や大きさを有する輝点を正確にカウントすることはできなかった。その原因のひとつとして以下の 2 つのことが考えられる。

(1) 一つの輝点の中のピークに山と谷が存在する場合があります、これが実際の数と異なるカウントをする原因となることがある。

一つの輝点は、必ずしも一本のピークからなるものではない。ATPの抽出具合や、微生物単独あるいはコロニーへの発光試薬のかかり方により、いびつな形で光る場合があります、3次元解析をするとピークに肩があったり、幾つかのピークが重なり合っている場合がある。この場合、実質的には輝点であっても、ピークに山と谷がある場合は山の数をそれぞれ輝点の数として認識してしまい、目視で数える輝点数との間にずれが生じる。図3はモニターテレビ上に映し出されたオリジナル画像(A)と改良前のカウント法によるカウント結果(B)を示す。

オリジナル画像の最上部にある輝点は目視では1つとカウントされるが、改良前の検出装置においては、この輝点を4つの輝点と判定している。さらに上部より2番目の輝点についても、従来のカウント法によれば2つに判定し、全体として10の輝点をカウントしている。これは、最上部の輝点が図3(B)の部分拡大図に模式的に示すような形状をしており、これを電氣的にカウントするとき、各4つの突出部a, b, c, dを夫々1の輝点として数えてしまった結果によるものである。(2) 輝度の強い輝点が発生した場合は、拡散した光が輝点の周囲にバックグラウンドのピークを大きく揺らがせるため、微生物由来のATPが存在しない部分に輝点と認識させるピークが発生する場合がある。

図4に示した画像データは大きな輝点の画像データであり、輝度が強いと輝点を中心にした光が拡散しているように表示される。そして、この拡散光が強い部分が生じ(輝点の左下の十字状の輝点)、この部分を輝点として認識されている。その他、強い拡散光の存在のため、図4の例では、本来1個と計数されるべきものが、3個と計数されている。

本発明は、上記問題に鑑みなされたものであり、映像信号をもとに電氣的に輝点の数をカウントするにあたり、ATPの輝点の形状に基づく上記カウント誤差と、大きい輝度に基づくカウント誤差をなくすことのできる菌数の計数方法を提供することを目的とするものである。

発明の開示

本願発明の一つの態様は、試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物の存在数を計数する方法において、撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状画素に対応させたメモリに読み取る段階と、

- 5 得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する段階と、
補正された各メモリの輝度データを設定した閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否かを判定する段階と、
前記閾値以上の輝度を持つ輝点を計数する段階と、
前記閾値以上の輝度を持つ輝点の隣接する所定範囲に所定以上の輝度を持つ輝点
10 点が存在するか否かを判定し、存在している場合には隣接する輝点の集合を1個の輝点として計数する段階
とからなる。

- また、本願発明の他の態様は、試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物の存在数を計数する装置の
15 において、撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状座標に対応させたメモリに読み取る手段と、

- 得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する手段と、
補正された各メモリの輝度データを設定した閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否かを判定する手段と、
20 所定レベル以上の輝度を持つ輝点を計数する手段と、
前記所定以上の輝度を持つ輝点の隣接する所定範囲に所定以上の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には隣接する輝点の集合を1個の輝点として計数する手段
とを有する。

- 25 上記発明の態様によれば、微生物から発生する蛍光の輝点を画像解析により電氣的に計数するに際し、本来、1個の微生物から発生している輝点をその不規則な形状によって2あるいはそれ以上の微生物に由来する蛍光と誤って判断して輝点の計数することを避けることができ、正確な計数を行うことができる。

また、本願発明の他の態様においては、一つの輝点中の中にピークの山と谷が

複数存在する場合、複数のピークを複数の輝点として計数することを避けるため、一つの輝点の隣接する周囲の所定範囲内に存在する輝点は、それぞれを独立した輝点として計数することはせず、それらの集合を一つとして計数処理を行うようにしている。

- 5 また、輝度の大きい輝点が存在する場合に、その光が周りに拡散して輝点として認識されることを避けるため、輝度の大きい輝点の周りの所定範囲に現れる輝点は、輝度の大きい輝点とともにその集合を一つと計数するように処理する。

- 10 本願発明のさらに他の態様においては、試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物の存在数を計数する方法において、撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状座標に対応させたメモリに読み取る段階と、

得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する段階と、

- 15 補正された各メモリの輝度データを設定した第1の閾値及び第1の閾値よりも大きい第2の閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否を判定する段階と、

所定レベル以上の輝度を持つ輝点を計数する段階と、を有し、

前記第1の閾値以上の輝度を持つ輝点の隣接する第1の所定範囲の画素に第1の閾値以上の輝点を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には隣接する輝点の集合を1個の輝点として計数し、

- 20 前記第2の閾値以上の輝度を持つ輝点の第2の所定範囲の画素に前記第1の閾値以上で前記第2の閾値以下の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には該輝点の集合を1個の輝点として計数することを特徴とする。

- 25 また、本願発明の他の態様においては、試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物の存在数を計数する装置において、撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状座標に対応させたメモリに読み取る手段と、

得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する手段と、

補正された各メモリの輝度データを設定した第1の閾値及び第1の閾値よりも大きい第2の閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否を判定す

る手段と、

所定レベル以上の輝度を持つ輝点を計数する手段を有し、

前記第 1 の閾値以上の輝度を持つ輝点の隣接する第 1 の所定範囲の画素に第 1 の閾値以上の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には

5 隣接する輝点の集合を 1 個の輝点として計数し、

前記第 2 の閾値以上の輝度を持つ輝点の第 2 の所定範囲の画素に前記第 1 の閾値以上で前記第 2 の閾値以下の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には該輝点の集合を 1 個の輝点として計数するようにしたことを特徴とする。

10 上記本願は発明の態様によれば、微生物から発生しり蛍光の輝点を画像解析により電氣的に計数するに際し、本来、1 個の微生物から発生している輝点をその不規則な形状によって 2 あるいはそれ以上の微生物に由来する蛍光と誤って判断して輝点の計数することを避けることができ、また、輝度の大きい輝点が発生した場合、それによる拡散光を独立した輝点と計数することを避けることができる。

15

図面の簡単な説明

図 1 は、微生物計数装置のシステムの概要を示す図である。

図 2 は、撮像装置で得られる輝点および輝点の 3 次元画像を示す図である。

20 図 3 は、モニターテレビ画面上の輝点の画像を示す図である。(A) はオリジナル画像を、(B) は電氣的に計数処理した結果を示す画像である。

図 4 は、輝度の大きい輝点とその周囲に発生した拡散光を示すモニターテレビ画面を示す図である。

図 5 は、本発明の第 1 の実施例による画像解析装置が行う計数の処理のフローチャートである。

25 図 6 は、各画素に対応するメモリのデータを示す図である。

図 7 は、本発明の第 1 の実施例の計数法により計数した結果をテレビモニター上に映した状態を示す図である。

図 8 は、本発明の第 2 の実施例による画像解析装置が行う計数の処理のフローチャートである。

図 9 は、各画素に対応するメモリのデータを示す図である。(A) は、映像の画素に対応したメモリの輝度値データを示す。(B) は、2つの閾値で2値かして得たデータをまとめたものである。(C) は、輝点を計数した結果を示す。

図 10 は、本発明の第 2 の実施例の計数法により計数した結果をテレビモニター上に映した状態を示す図である。

図 11 は、本発明の第 3 の実施例の処理を示すフローチャートである。

次に、本発明の実施の形態について図面と共に説明する。

まず、図 5 ～図 7 により本発明の第 1 の実施例について説明する。

本実施例においては図 1 に示した生菌測定装置を使用して生菌又はそのコロニーの数を計数するが、画像取得後の輝点の計数方法に改良を加えたものであり、以下、図 5 ～図 7 に基づいて説明する。

図 5 は、本実施例における画像読み取り後のデータ解析装置 4 が行う輝点の計数処理のための処理フローを示す。まず、発光処理された生菌を高感度テレビカメラで画像として読み取る(ステップ S10)。読み取られた画像は光の強度分布を表す輝度値の画像データとして画像メモリに元画素データとして書き込まれる(S12)。この画像メモリは、マトリックス状のアドレスを有するメモリを有し、座標位置と試料のフィルター面の位置とが対応するようにしてある。

次に、測定された元画素データをもとに、バックグラウンドによる輝度値の補正を行う(S14)。この輝度値の補正は、各アドレスの輝度値に対し、フィルタリングマトリックスの範囲(例えば、特定アドレスを中心とする 3×3 のマトリックス)で切り出し、切り出した範囲の輝度値に対して加算平均を計算し、各アドレスに対応するバックグラウンド画像値として各アドレスに書き込む。これにより各アドレス毎に対応するバックグラウンド値が書き込まれる。次いで、各アドレスに読み込まれた元画像データから各アドレスに対応するバックグラウンド値を減算する。これによって、各アドレスの輝度補正されたデータが書き込まれる。

図 6 (A) は、各メモリに書き込まれた補正後の輝度値の例を示している。次に補正された輝度値のデータを所定の閾値により 2 値化していく(S16)。図 6 の例では、閾値を 5 とし、輝度値が 5 以上のものを 1 とし、5 未満のものを 0 として 2 値化した例である。図 6 (B) は (A) のデータを 2 値化して結果を

示している。2 値化した結果、1 であるものは、所定レベル以上の輝度を有するものであり、生菌由来の発光に基づくものである。

本実施例においては、2 値化された結果の 1 のものを全て生菌又はそのコロニー（以下、総称して「生菌」という）1 個に対応させて計数することはせず、
5 さらに、発光形態を調査して生菌の数の計数を行う。

2 値化されたデータマトリックスにもとづきは、次に、各アドレスについて順次、1 か 0 かの判定を行う（S 1 7）。そして、該当アドレスの値が 1 のものであれば、次に、その該当アドレスの隣接する周囲に 1 の値を持つアドレスが存在するかどうかを判断する（S 1 8）。なお、ここで、1 でなければ、即ち、0 で
10 あれば、輝点でないと判断する（S 1 9）。ステップ 1 8 において、隣接する周囲に 1 が存在している場合には、その画素の集合を 1 個と判断し、それらの集合に計数番号を順次付していく。図 6（B）の 2 値化データを例にとれば、アドレス（2，B），（2，C）及び（3，B）は互いに隣接している輝点である。したがって、ステップ 2 0 において、アドレス（B，2）の輝点を判断した時点で、
15 アドレス（B，2），（C，2）及び（B，2）のアドレスに計数番号 1 を付与する。次に、（2，E）のアドレスにおいては、輝点を示す 2 値化データが存在し、周囲に 1 を持つアドレスは存在しないから、この場合は、1 個の輝点と判断し（S 2 2）計数番号 2 を付与する。このようにして、以下、計数番号が付与されていないアドレスを順次判定し、すべてのアドレスについて判定を行い、最終的に、計数番号の最大の値が、生菌による輝点の数となる（S 2 2）。全てのアドレスの判定が終了したことを確認し（S 2 6）、計数処理を終了する。
20

以上のように、マトリックス状のメモリに得られた 2 値化データのうち、輝点を表すデータが隣接するものは、それらの集合を 1 つの輝点として計数することにより、実際の生菌の数と合致する計数を行うことができる。すなわち、生菌
25 1 個に由来する輝点であるにもかかわらず、前述の図 3 に示した例のように、4 個と計数するようなことを回避することができる。

図 7 は、本発明による計数の処理方法により画像解析装置が行った計数結果を示し、図 3（A）のオリジナル画像が示すとおり 6 個の生菌の数と一致する、計数値を表示しており、画像解析に基づく電氣的な自動計数によっても正確な計数

が可能となることを示している。

次に、本発明の第2の実施例について、図8～図10に基づいて説明する。

本実施例においては図1に示した生菌測定装置を使用して生菌の数を計数するが、画像取得後の輝点の計数方法に改良を加えたものである。

- 5 図8は、本実施例における画像読み取り後のデータ解析装置4が行う輝点の計数処理のための処理フローを示す。先ず、発光処理された生菌を高感度テレビカメラで画像として読み取る（ステップS100）。読み取られた画像は光の強度分布を表す輝度値の画像データとして画像メモリに元画素データとして書き込まれる（S102）。この画像メモリは、マトリックス状のアドレスを有するメモリを有し、座標位置と試料のフィルター面の位置とが対応するようにしてある。
- 10 次に、測定された元画素データをもとに、バックグラウンドによる輝度値の補正を行う（S104）。この輝度値の補正は、各アドレスの輝度値に対し、フィルタリングマトリックスの範囲（例えば、特定アドレスを中心とする3×3のマトリックス）で切り出し、切り出した範囲の輝度値に対して加算平均を計算し、各
- 15 アドレスに対応するバックグラウンド画像値として各アドレスに書き込む。これにより各アドレス毎に対応するバックグラウンド値が書き込まれる。次いで、各アドレスに読み込まれた元画像データから各アドレスに対応するバックグラウンド値を減算する。これによって、各アドレスの輝度補正されたデータが書き込まれる。

図9（A）は、各メモリに書き込まれた補正後の輝度値の例を示している。

- 20 次に補正された輝度値のデータを所定の閾値により2値化していく（S106）。本実施例では、輝度値（L）を2値化を2つの閾値L1、L2（ $L2 > L1$ ）を設定し、 $L \geq L2$ にあるもの（A）と $L2 > L \geq L1$ のもの（B）を夫々判別して画像に対応させてマトリックス状のメモリに書き込むようにしている。

- 25 図9（B）は、2段階で2値化した結果をまとめて書き込んだものである。この例では $L2 = 8$ 、 $L1 = 5$ と設定している。 $L1 = 5$ は、輝度値が5以上のものを生菌よりの発光と識別するものであり、 $L2 = 8$ は、そのうちでも特に輝度の大きい輝点を識別するための閾値である。

本実施例においては、2値化して得た所定レベルの輝度値のものを全て生菌1個に対応させて計数することはせず、さらに、発光形態と、発光の強さを識別し

てこれを考慮して生菌の数の計数を行う。

- 5 先ず、作成されたデータマトリックスにもとづき、輝点と判定されたもののうち、輝度がレベルL 2より大であるかを判断する（S 1 0 8）。そして、Aと判定されたものについては、さらに、その周囲に輝度B以上のものがあるかどうかを判断する（S 1 1 0）。輝度B以上の輝点が存在すれば、それは、もとの輝点と同じ生菌由来の蛍光であると判断し1つ集合として1と計数する（S 1 1 2）。

図9（B）に示した例では、座標（E, 6）と（E, 7）に対応する輝点は、1つの集合のものとして計数される。ステップ1 1 0において、周囲に輝度Aが存在しない場合は1個をカウントする（S 1 1 4）。

- 10 ステップ1 0 8において、輝度Aではない場合は、輝度Bの輝点かどうか判断される（S 1 1 6）。輝度Bであると判断されると、次にその画素を中心として、周囲に輝度Bの輝点が存在しているかどうか判断される（S 1 1 8）。そして、輝点Bが隣接して存在していれば、その輝点は、中心の輝点と同じ生菌由来の蛍光と判断し、それらの集合を1と計数する（S 1 2 2）。
- 15 ステップ1 1 8において、周囲の範囲内にはない場合は、さらに、その画素を中心に周囲に輝度Aの輝点が存在しているかどうか確認される（S 1 2 0）。そして、存在していれば、その輝点は輝度Aの輝点の拡散光により発生したものであると判断し、カウントしない（S 1 2 4）。なおステップ3 0において、輝点Bが存在し、その周囲5画素の範囲に輝度Aが存在しなければ、1をカウントする（S 1 2 6）。なお、ステップ1 1 8において周囲3画素内に輝度Bがあれば、
- 20 輝度Bの輝点の集合として1個と判断する。

- 以上の処理でカウントされた輝点あるいはその集合は、最終的に合計される（S 1 2 8）。図9（C）は周囲に所定レベル以上の画素が存在しているものについて、それらの輝点の集合を生菌1とカウントするために画素に対応したメモリ
- 25 にカウント番号を付した様子を示すものである。座標（E, 1）,（E, 2）,（F, 2）の輝点は通常輝度レベルBの蛍光を発する生菌1をしめし、座標（E, 6）,（E, 7）,（H, 6）は、輝度レベルAを持つ輝点とその拡散光によるものと判断し、1つの集合として生菌の2番目のカウント番号を付した状態を示す。

全輝度マップのすべてのアドレスのメモリが判定されたことを確認して（S 130）、この計数処理を終了する。

5 以上のように、本発明においては、マトリックス状のメモリに得られた2値化データのうち、輝点を表すデータが隣接するものは、それらの集合を1つの輝点として計数し、また所定レベル以上の大きい強い輝度を持つ輝点については、その周囲の5画素の範囲内に通常レベルの輝度を持つ輝点が存在していても、それらを1つの生菌に由来する蛍光と判断し、輝点の集合を1としてカウントするようにしたものである。これにより、実際の生菌の数と合致する計数を行うことができる。すなわち、生菌1個に由来する輝点であるにもかかわらず、前述の図
10 3に示した例のように、4個と計数するようなことを回避することができ、また、図4に示したように、大きい輝度をもつ輝点の場合に発生する近傍の拡散光を別の生菌由来の蛍光による輝点としてカウントすることを避けることができる。

図10は、本発明による計数の処理方法により画像解析装置が行った計数結果を示し、図4の画像が拡散による蛍光をカウントして3個と計数したものは、それ
15 らの集合を1と適切に計数している。

画像解析に基づく電氣的な自動計数によっても正確な計数が可能となることを示している。

上述の第2の実施例は計数すべき微生物による輝点の拡散光という偽輝点を計数しないようにして精密な計数を可能にするものであるが、微生物の有無を確認
20 するだけで簡易的な計測であれば、先の第1の実施例に示した方法で十分である。ただし、本発明者の研究によれば、拡散光による偽輝点は条件にもよるが大量に発生する場合があります、その場合、計数値が10倍～50倍も多くなることがあり、少なくともこの拡散光の影響を除去したい場合には、第1の実施例の図5に示した処理フローにおいて、ステップ14の画像データをチェックし、拡散光を発生
25 するような輝度が高く、所定以上の大きさを持った輝点の有無を確認し、そのような輝点の確認したら、第2のしきい値L2で2値化する。得られた2値化マトリックスは拡散光の影響を除去したものが得られる。

次に図11は、本発明の第3の実施例を示し、拡散光の影響がどの程度か大まかに把握した場合に実施する例を示す。なお、本実施例は、図5に示す処理を基

本にしており、説明の便宜上、同一の処理には同一の符号を用いて説明している。

図10に示すフローチャートに示すように、ステップ14で得た画像データはさらに、拡散光を発生するような輝点が存在するかどうかを、所定以上の輝度（例えば、輝度値10）で画素面積 3×3 以上の輝点が存在するかどうかを確認し（S300）、そのような輝点が存在しない場合（M1）、存在する場合（M2）それぞれメモリに記憶する。そして、第1の実施例のように、第1のしきい値L1で2値化し、輝点を計数してその数を確認しておく（S10～S26）。
5
10
15
なお、ここで、ステップ20の後、更に、離れた画素であってもその距離が2画素以内のものは、同一輝点のものとしてカウントするための処理を加えている（S306～S312）。第1のしきい値に基づく計数の終了後、ステップ300においてか確認されたメモリM2に輝点が記憶されたか否かの判断が実行されたかどうかの判断を経て（S316）、初めての判断の結果、輝点の存在が在れば（S318）、ステップ14で得た画像データ（別途メモリにデータを保存しておくものとする。）を第2のしきい値L2により、2値化する（S320）そして、ステップ17よりステップ26の処理を同様に実行する。

第1のしきい値L1と第2のしきい値L2とにより得られた輝点の数はそれぞれ記録してし保持しておき、これらの輝点計数の差を知ることにより、大まかな拡散光の影響を数量的に把握することができる。

20
上述の如く本発明によれば、生菌より発生する蛍光の輝点を電氣的に計数して生菌の個数を計数する方法において、輝点の形状により1個を複数個に計数することにより生ずる計数誤差を無くすことができ、正確な生菌の計数が可能となる。

また、生菌より発生する蛍光の輝点を電氣的に計数して生菌の個数を計数する方法において、輝点の形状により1個を複数個に計数することにより生ずる計数誤差を無くすことができ、また、輝度の大きい輝点から発生する拡散光を独立して発生した輝点と判断して計数することを避けることができる。これにより、微生物を電氣的の正確に計数することが可能となる。
25

請求の範囲

1. 試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物又はそのコロニーの存在数を計数する方法において、
 - 5 撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状画素に対応させたメモリに読み取る段階と、
得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する段階と、
補正された各メモリの輝度データを設定した閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否を判定する段階と、
 - 10 前記閾値以上の輝度を持つ輝点を計数する段階と、
前記閾値以上の輝度を持つ輝点の隣接する所定範囲内の画素に所定以上の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には隣接する輝点の集合を1個の輝点として計数する段階
とからなる微生物計数方法。
 - 15 2. 試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物又はそのコロニーの存在数を計数する装置において、
撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状画素に対応させたメモリに読み取る手段と、
得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する手段と、
 - 20 補正された各メモリの輝度データを設定した閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否を判定する手段と、
前記閾値以上の輝度を持つ輝点を計数する手段と、
前記閾値以上の輝度を持つ輝点の隣接する所定範囲に所定以上の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には隣接する輝点の集合を1個
 - 25 の輝点として計数する手段
とを有する微生物計数装置。
 3. 試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物又はそのコロニーの存在数を計数する方法において、
撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状座標に対応させた

メモリに読み取る段階と、

得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する段階と、

補正された各メモリの輝度データを設定した第1の閾値及び第1の閾値よりも大きい第2の閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否を判定する段階と、

5

所定レベル以上の輝度を持つ輝点を計数する段階と、を有し、

前記第1の閾値以上の輝度を持つ輝点の隣接する第1の所定範囲の画素に第1の閾値以上の輝点を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には隣接する輝点の集合を1個の輝点として計数し、

10

前記第2の閾値以上の輝度を持つ輝点の第2の所定範囲の画素に前記第1の閾値以上で前記第2の閾値以下の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には該輝点の集合を1個の輝点として計数することを特徴とする微生物又はそのコロニーの存在数を計数する方法。

4. 試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物又はそのコロニーの存在数を計数する装置において、

15

撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状座標に対応させたメモリに読み取る手段と、

得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する手段と、

補正された各メモリの輝度データを設定した第1の閾値及び第1の閾値よりも大きい第2の閾値により2値化し、所定レベル以上の輝度値を持つか否を判定する手段と、

20

所定レベル以上の輝度を持つ輝点を計数する手段を有し、

前記第1の閾値以上の輝度を持つ輝点の隣接する第1の所定範囲の画素に第1の閾値以上の輝点を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には隣接する輝点の集合を1個の輝点として計数し、

25

前記第2の閾値以上の輝度を持つ輝点の第2の所定範囲の画素に前記第1の閾値以上で前記第2の閾値以下の輝度を持つ輝点が存在するか否かを判定し、存在している場合には該輝点の集合を1個の輝点として計数するようにしたことを特徴とする微生物又はそのコロニーの存在数を計数する装置。

5. 試薬により発光処理を施した微生物からの蛍光を撮像装置で得た画像の輝点の数を計数して微生物又はそのコロニーの存在数を計数する方法において、

撮像装置で得た画像の輝度データを2次元のマトリックス状座標に対応させたメモリに読み取る段階と、

- 5 得られた輝度データをバックグラウンド値に基づいて補正する段階と、
補正された輝度データを第1の閾値で2値化する段階と、
前記第1の閾値よりも大きい第2の閾値で2値化する段階と、
前記第1閾値以上の輝度値を持つか否かを判定する段階と、
前記第2の閾値以上の輝度値を持つか否かを判定する段階と、
- 10 前記第1の閾値以上の輝度を持つ輝点を計数する段階と、
前記第2の閾値以上の輝度を持つ輝点を計数する段階と、
前記補正された輝度データ内に所定以上の面積を有し、前記第2の閾値を越える輝点の存在の有無を確認する段階を有し、
前記所定以上の面積を有し前記第2の閾値を越える輝点を持つ輝点が存在した
- 15 場合には少なくとも前記第2の閾値で画像データを2値化した後、前記第2の閾値以上の輝度値を持つ輝点を計数することを特徴とする微生物又はそのコロニーの存在数を計数する方法。

FIG.1

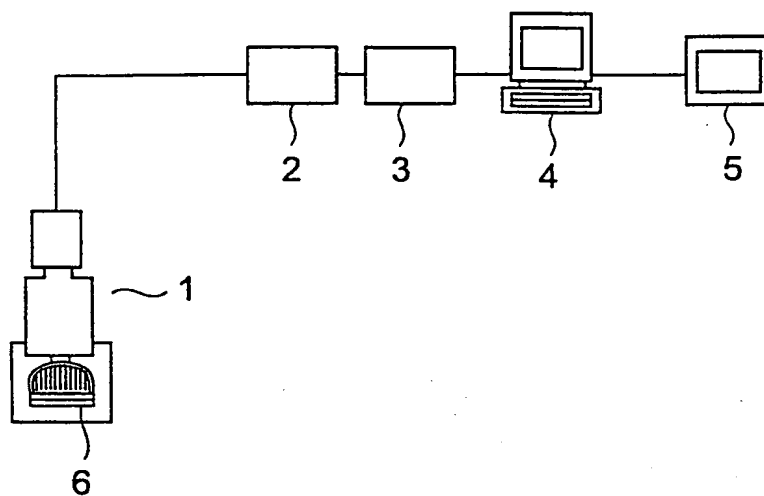


FIG.2

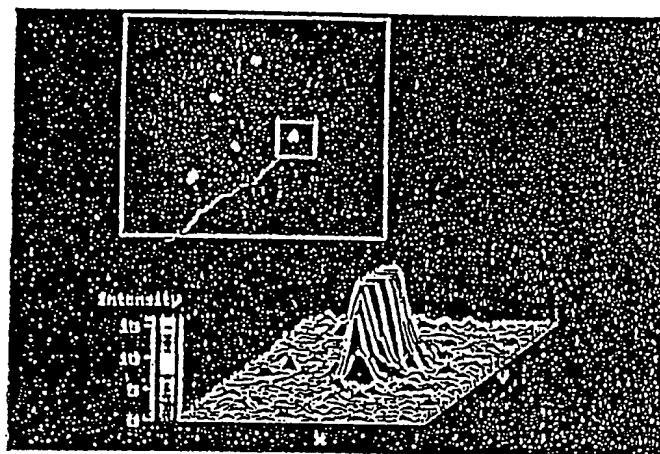


FIG.3

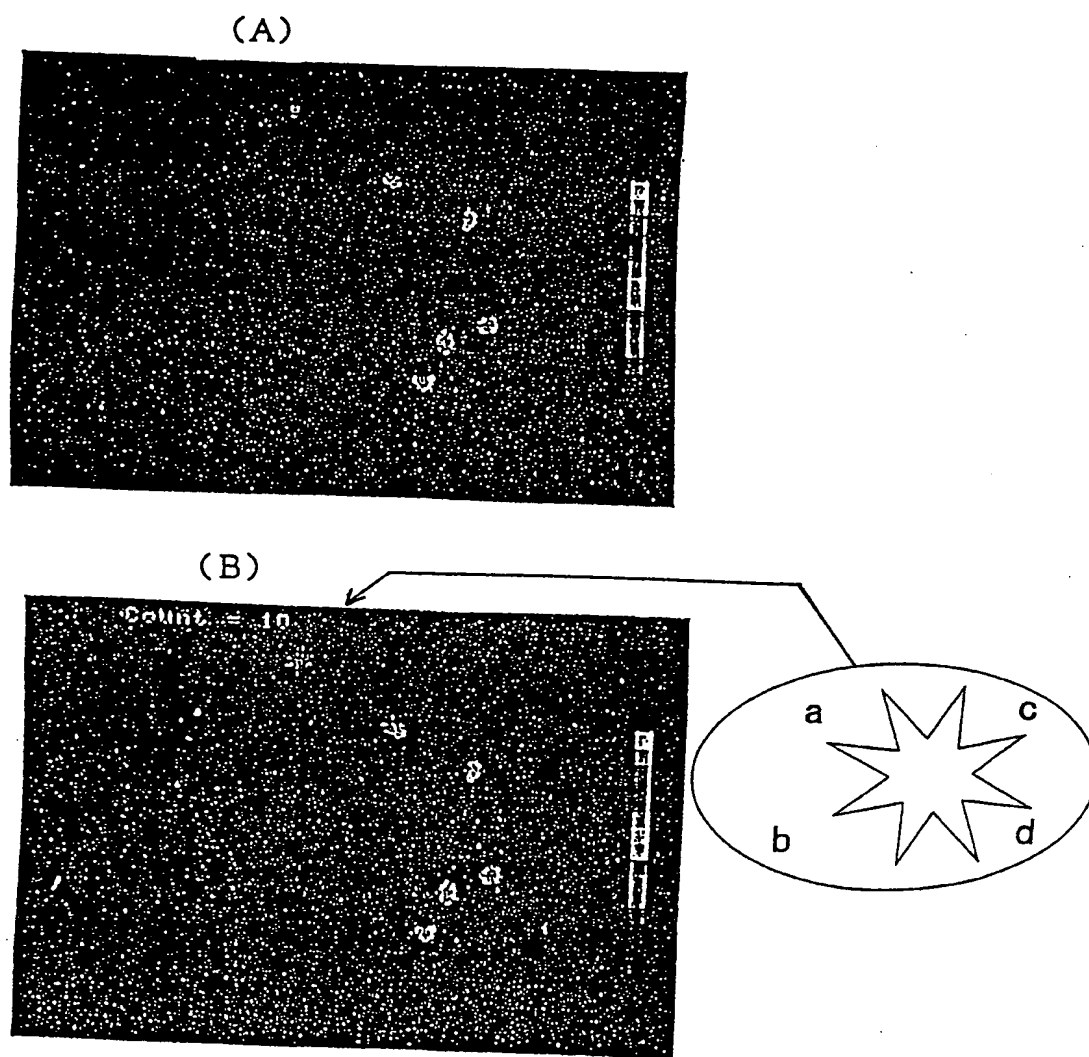


FIG.4

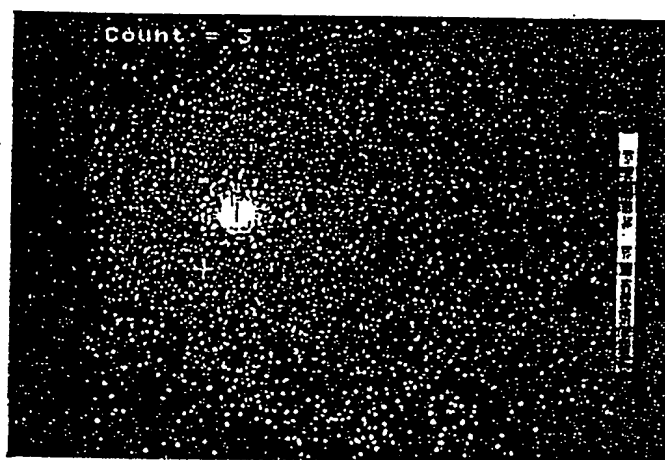


FIG. 5

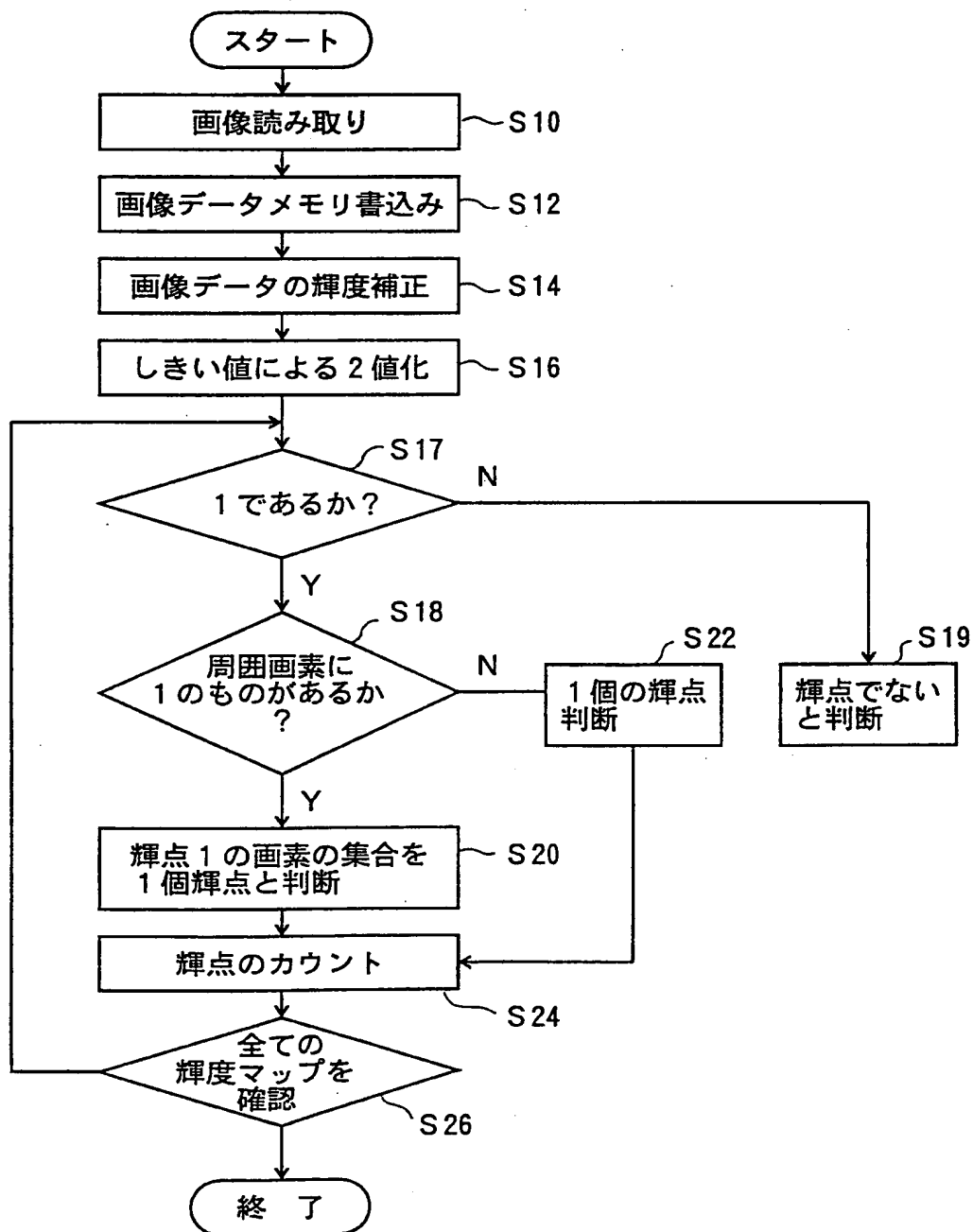


FIG. 6

(A)

	A	B	C	D	E	...
1	1	2	0	3	4	
2	2	5	6	2	6	
3	0	6	2	0	1	
4	2	3	4	1	5	

(B)

	A	B	C	D	E	...
1	0	0	0	0	0	
2	0	1	1	0	1	
3	0	1	0	0	0	
4	0	0	0	0	1	

(C)

	A	B	C	D	E	...
1	0	0	0	0	0	
2	0	1	1	0	2	
3	0	1	0	0	0	
4	0	0	0	0	3	

FIG.7

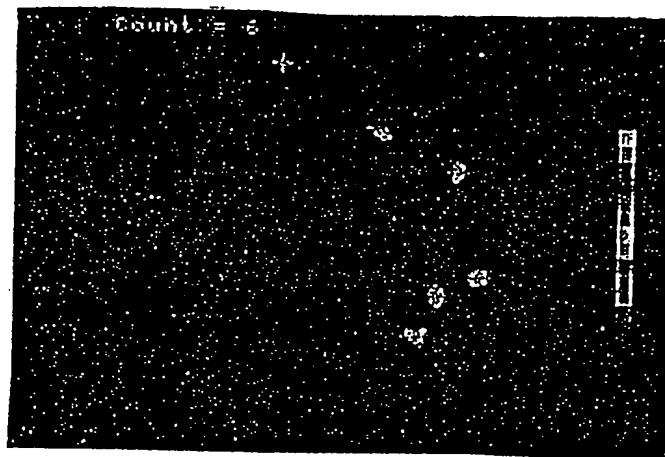


FIG. 8

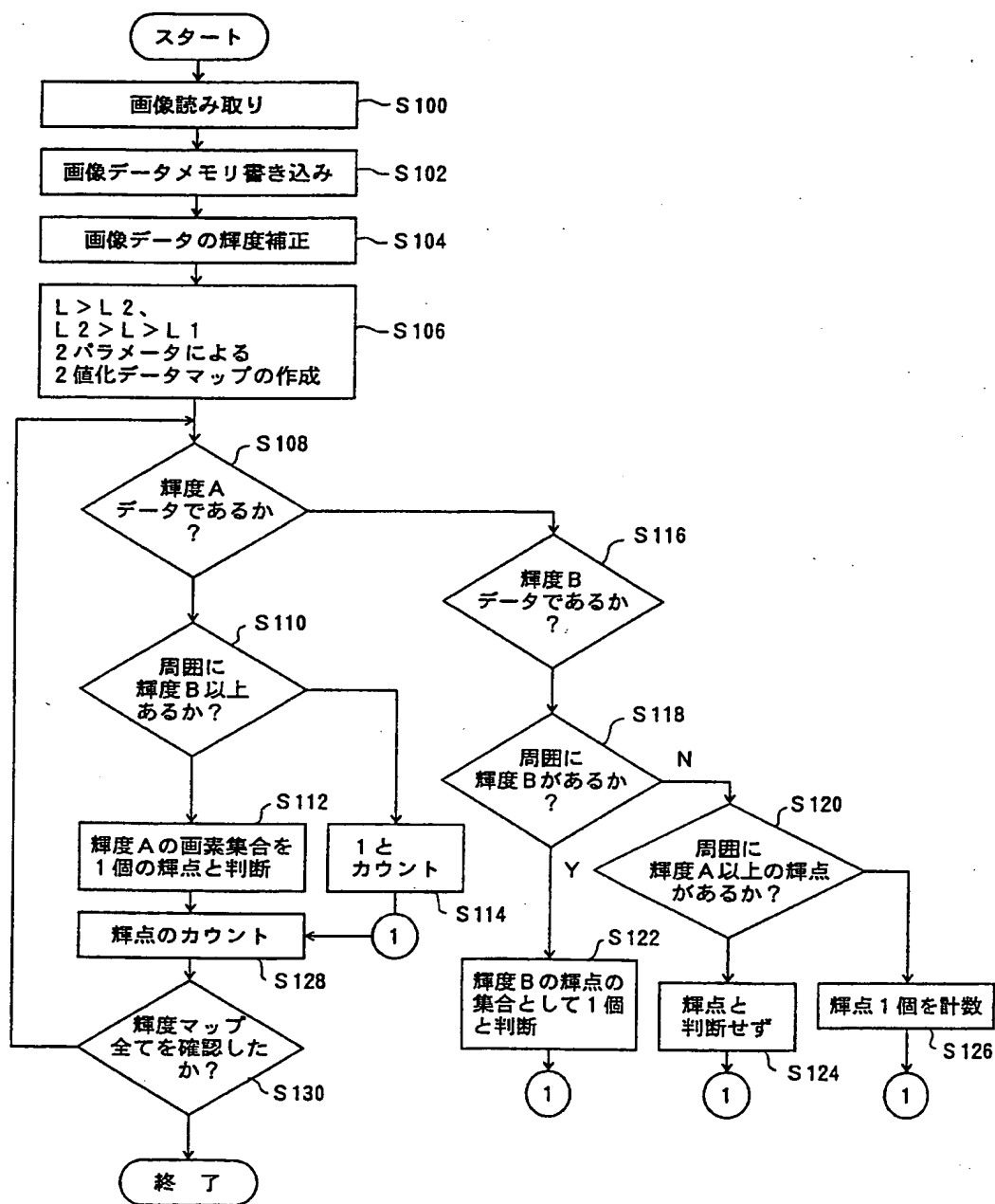


FIG. 9

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	0	1	2	0	5	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	6	5	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	1	3	4	0	3	0	0	1	2	L 2 : 8
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	L 1 : 5
6	1	2	1	0	10	0	3	5	1	
7	0	0	0	1	8	0	2	1	0	
8										
9										

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	0	.	.	.	B					
2					B	B				
3										
4	0	L 2以上 : A
5										L 2 > L > L 1 : B
6			0	0	A	0	0	B		L < L 1 : 0
7					A	0	0			
8										
9										

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1					1					
2					1	1				
3										
4										
5										
6					2			2		
7					2					
8										
9										

FIG.10

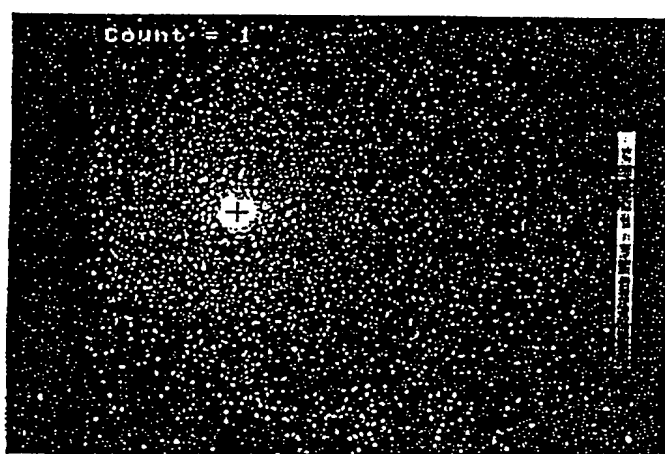
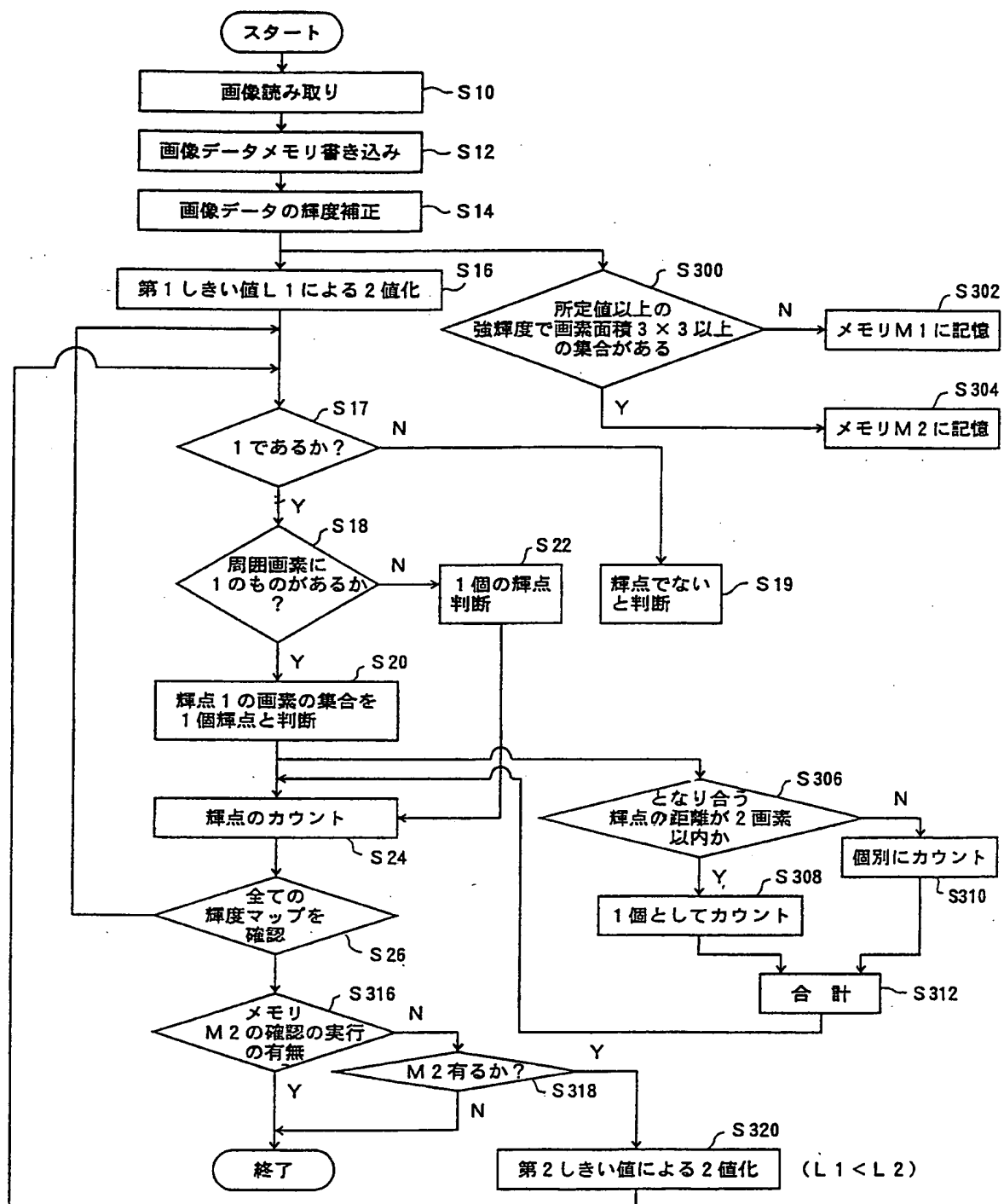


FIG. 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/66, C12Q1/04, G01N21/64, G01N21/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-C12Q1/66, G01N21/64, G01N21/76

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-237793, A (Nippon Millipore K.K.), 30 August, 1994 (30.08.94) (Family: none)	1-5
A	JP, 3-224738, A (Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.), 03 October, 1991 (03.10.91) (Family: none)	1-5
A	JP, 5-223750, A (Fujikura Ltd.), 31 August, 1993 (31.08.93) (Family: none)	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 March, 2000 (28.03.00)

Date of mailing of the international search report
04 April, 2000 (04.04.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/07417

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/66, C12Q1/04, G01N21/64, G01N21/76

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00~C12Q1/66, G01N21/64, G01N21/76

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-237793, A (日本ミリポア株式会社) 30. 8月. 1994 (30. 08. 94) (ファミリーなし)	1-5
A	JP, 3-224738, A (三菱重工株式会社) 3. 10月. 1991 (03. 10. 91) (ファミリーなし)	1-5
A	JP, 5-223750, A (株式会社フジクラ) 31. 8月. 1993 (31. 08. 93) (ファミリーなし)	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 03. 00

国際調査報告の発送日

04.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.